

チオフェンのラットを用いる 反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of Thiophene by Oral Administration in Rats

要約

チオフェン(CAS No. 110-02-1; 化学式, C_4H_4S ; 分子量, 84.14)は、5員環にイオウ1原子を有するヘテロ環系化合物で、ベンゼンと同様な溶剤として、また、樹脂の架橋剤や染料および医薬品などの化学物質の中間体として広く使用されている¹⁾。チオフェンは、また、工業用のみならず、コーヒーなどの食品中にも含有されている²⁾。疫学的調査から、チオフェンは、職業的にこれを使用する労働者に腎毒性を引き起こし、循環系に悪影響を及ぼし、光に対する目の反応性に悪影響を及ぼすことが報告されている³⁾。LD₅₀値は、経口投与において、ラットでは1400 mg/kg、マウスでは420 mg/kgであり⁴⁾、マウスの腹腔内投与では100 mg/kg⁵⁾、ウサギの皮下投与では830 mg/kgである⁶⁾。チオフェンの8000 ppmをラットに1時間吸入暴露すると、暴露されたチオフェンの16.3%は、呼吸器から吸収されることが明らかにされているが⁷⁾、チオフェンの吸入暴露におけるLD₅₀値は、ラットでは、9500 mg/m³/2hrとされている⁸⁾。経口投与されたチオフェンの約30%はそのまま呼気から排泄されるが、その他は肝臓で代謝され、ごく一部が糞便から排泄され、約70%は尿中から排泄される⁹⁾。チオフェンは、肝臓のチトクロームP450 mono-oxygenasesにより、求電子性の活性中間体にバイオトランスフォームされ⁹⁾、これが肝臓の壊死を惹起すること¹⁰⁾、および、チオフェンを投与すると小脳の顆粒細胞が壊死すること¹¹⁻¹³⁾などが報告されている。長期間の暴露については、ラットに対して毎日4時間ずつ1~9ヵ月吸入暴露した成績があり、肺および気管に炎症が、心筋には軽度なネクロパイオーシスが、また、副腎には脂質の増加がそれぞれ惹起されることが報告されている²⁾。しかし、経口投与による反復投与毒性については評価されていない。生殖発生毒性に関しては、チオフェンが精子形成に影響を及ぼすことが報告されているが¹⁴⁾、生殖機能に及ぼす影響は評価されていない。本試験では、OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環としてチオフェンの0(溶媒対照)、25、100および400 mg/kgをSprague-Dawley系ラット(Crj:CD)の雌雄(各13匹/群)に交配前2週間および交配期間2週間経口投与し、さらに雄では交配期間終了後2週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育3日まで投与を継続して親動物に対する反復投与毒性および生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

その結果、雄では、100 mg/kg以上の投与量は、投与

後に、寄り掛かり姿勢など一般状態を変化させ、400 mg/kg投与により、投与期間初期に一過性に摂餌量および体重増加を抑制した。投与期間末期に摂餌量は高値を示したが、体重増加は軽度に抑制され、投与37日に実施した尿検査では、pHが異常な高値を示した。

42回反復投与後の剖検では、100 mg/kg以上の投与量により小葉中心性に肝細胞は肥大し、マクロファージが浸潤し、肝臓重量比体重値が増加した。さらに、400 mg/kg投与により、小葉中心性の肝細胞壊死、小葉中心部の肝細胞細胞質の均質化および小空胞化が認められ、総ビリルビン濃度および総コレステロール濃度ならびに肝臓機能の指標となる各種酵素活性が高値を示し、100 mg/kg以上の投与量のチオフェンは、肝臓毒性を示した。また、400 mg/kg投与により、小脳顆粒細胞の核濃縮あるいは壊死が1例に観察され、400 mg/kgの投与量のチオフェンは、小脳に対する軽度な毒性を現した。これらの変化に伴い、100 mg/kg以上の投与量ではブドウ糖濃度およびアルカリフォスファターゼ活性が低下し、無機リン濃度が上昇した。このほか、100 mg/kg以上の投与群において腎臓重量比体重値が増加し、400 mg/kg投与によりeosinophilic bodyがやや増加したが、腎機能の異常を示す変化は認められなかった。400 mg/kg投与群において脾臓重量が低下したが、病理組織学的異常は認められなかった。その他の器官にチオフェンの毒性を示唆する変化は認められず、25 mg/kgの投与量のチオフェンには毒性は認められなかった。

雌動物では、100 mg/kg以上の投与量は、投与後に寄り掛かり姿勢など一般状態を変化させ、400 mg/kg投与により摂餌量および体重増加を投与期間初期に一過性に抑制し、運動失調を惹起し、1例は投与8日に瀕死状態となったため剖検した。

生存例の剖検では、100 mg/kg以上の投与により、変化の有無に個体差はあるものの、400 mg/kg投与により雄の肝臓に惹起されたのと同質の所見が観察され、肝臓重量比体重値も増加した。また、小脳の顆粒細胞壊死が100 mg/kg以上の投与群に観察され、400 mg/kg投与群では、大脳の脳室拡張およびその周囲の浮腫も認められた。これらのことから、100 mg/kg以上の投与量は、肝臓および小脳に障害を与える毒性量であると考えられる。これらの変化は、瀕死屠殺例にも観察され、投与期間初期から認められた。また、生存例の各所見は雄と比較してより増強されていた。100 mg/kg以上の投与により尿細管上皮の空胞変性が有意に増加し、400 mg/kg投与群において腎臓重量比体重値が高値を示した。その他

の器官にチオフェンの毒性を示唆する変化は認められず、25 mg/kgの投与量のチオフェンには毒性は認められなかった。

一方、生殖発生毒性に関しては、400 mg/kgまでの投与量は、交尾、排卵および受胎に毒性を示さなかった。また、チオフェン投与に起因する分娩異常はいずれの投与群にも認められなかった。しかし、100 mg/kg以上の投与群の小脳に所見が認められた動物の多くに、哺育行動の廃絶や、泌乳の低下が認められ、100 mg/kg以上の投与量は、母動物の哺育状態に影響を及ぼす毒性量であると考えられる。

出生日の児の生存性および性比にはチオフェン投与の影響は認められなかったが、400 mg/kg投与群において、出生日および哺育4日の体重、ならびに新生児の4日の生存率が低値の傾向が認められた。100 mg/kg以下の投与群にチオフェン投与の影響は認められず、チオフェン投与に起因した形態異常はいずれの投与群にも観察されなかった。

これらのことから本試験条件下では、チオフェンの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに25 mg/kg/dayであり、生殖発生毒性に関する無影響量は、雄では、400 mg/kg/day、雌では、25 mg/kg/day、新生児では100 mg/kg/dayであると推定される。

方法

1. 被験物質

チオフェン〔ロット番号、FG301(東京化成工業株)；純度、98%(wt%)；不純物、不明〕は、水には不溶であるが、多くの有機物に溶解する、臭気を有する無色透明の液体である。本被験物質は、使用時まで冷蔵条件下で保管し、コーンオイル〔ロット番号、V4K5052(ナカライテスク)〕に溶解して、いずれの用量においても1回の投与液量が5 ml/kgになるように含量を調整し、投与液とした。投与液は、室温、遮光条件下で保管し、調製後8日以内に投与した。投与液中の被験物質は、室温、遮光条件下で少なくとも8日間安定であり、動物飼育室内で30分間開封してもチオフェン濃度は変化せず、また、使用した投与液にはほぼ所定量のチオフェンが含有されていたことを確認した。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、雌雄とも7週齢にて購入したSprague-Dawley系ラット(Crj:CD, SPF)を使用した。動物は、入荷後1週間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、一般状態に異常が認められなかったものを試験に供した〔群分け時体重範囲：雄277.4～328.2 g、雌207.1～224.7 g〕。

各動物は、温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数約15回/時間、照明12時間(午前7時～午後7時)に条件設定された飼育室で、金属製金網床ケージ(日本ケージ)に個別に収容して飼育し、固型飼料(CA-1, 日本クレア)および水道水を自由に摂取させた。妊娠18日以後の母動物には、飼育ケージの床に金属製床板を敷き、床

敷として木製チップ(ホワイトフレーク[®], 日本チャールス・リバー)を適宜供給した。供給した飼料、水および床敷には試験に支障を来す可能性の考えられる混入物はなかった。

3. 群分け法

雌雄とも初回投与日の体重をもとに体重別層化無作為抽出法に準じて群分けし、1群につき各13匹を用意した。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

チオフェンの投与量は、次項に示す予備試験の結果を参考に25、100および400 mg/kgとした。投与液量は、各用量とも5 ml/kgとし、対照群のラットには、チオフェンの媒体としたコーンオイルをチオフェン投与群と同一条件にて投与した。各用量の投与検体は、雄に対しては交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後14日間の連続42日間、また、雌に対しては交配前14日間と最長14日間の交配期間中(交尾まで)ならびに交尾雌では妊娠期間を通して分娩後の哺育3日まで毎日1回、ラット用胃管を用いて強制的に経口投与した。毎日の投与は、原則として一定時刻の間(通常13時～15時)に行い、各動物の投与液量は、雄ならびに交配前および交配期間中の雌については週1回の測定体重をもとに、また、交尾成立後の雌については妊娠0日の体重をもとにそれぞれ算定した。

5. 投与量の設定

チオフェンの0(溶媒対照)、25、100および400 mg/kgを8週齢のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD)の雌雄各5匹に1日1回、14日間、反復して経口投与した。また、経口投与されたチオフェンの一部は呼気としてそのまま排泄されること⁸⁾、およびチオフェンは吸入により呼吸器から吸収されること⁷⁾が報告されていることから、呼気として排泄されたチオフェンが同一飼育室内で飼育されている対照群に影響を及ぼす可能性の有無を検討するために、雌雄各5匹を別室で飼育し、これに対照群と同様に溶媒を投与した。

その結果、100 mg/kg以上のチオフェンは投与開始後一般状態を変化させ、14日間の反復経口投与によって肝臓重量を増加させた。さらに、400 mg/kgのチオフェンは、雌雄の体重増加および摂餌量を一過性に抑制し、雄の肝機能を変化させたことから、400 mg/kg/dayは6週間の反復投与により、何らかの毒性変化の期待される量であると考え、これを併合試験における高用量に設定した。また、低用量には毒性変化を生じないことの期待される25 mg/kg/dayを設定し、中用量には等比中項の100 mg/kg/dayを設定した。予備試験において、いずれの検査項目についても、対照群には、呼気から排泄されたチオフェンによる暴露の影響を示唆する変化は認められなかったことから、併合試験の対照群は、チオフェン投与群と同室で飼育することとした。

6. 観察方法

1) 親動物

A. 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日観察した。

B. 体重

雌雄とも、全例について体重を試験期間中週1回〔雄：投与1, 8, 15, 22, 29, 36, 42日, 雌：投与1, 8, 15日〕および解剖日に測定した。投与22日までに交尾しなかった雌は、投与22日にも体重を測定した。また、交尾成立雌では、妊娠0, 7, 14, 20日, 分娩した雌では、分娩後0および4日(哺育0および4日)の体重を測定した。

C. 摂餌量

雌雄とも、全例について体重測定日と同日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を算定した。2週間の交配期間中の摂餌量は測定しなかった。交尾成立雌では、妊娠0~7, 7~14, 14~20日の、さらに、分娩した雌では、哺育0~4日の摂餌量を測定した。

D. 尿検査

予備試験では、投与2および9日に尿検査を実施したが、異常は認められなかった。併合試験では、尿の性状の異常の有無を確認するために、投与期間末期の投与37日に、雄の全例について尿検査を実施した。尿は、動物を4時間代謝ケージに収容して蓄尿することにより採取し、pH測定ならびに潜血、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲンおよびビリルビンの含有の程度は試験紙法(マルティスティックス/クリニテック200(マイルス三共))により判定し、沈渣は鏡検した。

E. 交配

交配は、投与15日(投与開始日=投与1日)の夕方から最長2週間、同一群内の雌雄を1対1で同居させて行った。交尾の確認は、毎朝、腔栓および腔垢中の精子の存在を調べることにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配結果から、各群について交尾率[(交尾動物数/同居動物数)×100]、受胎率[(受胎動物数/交尾動物数)×100]、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情数を求めた。

F. 分娩状態

各群とも交尾雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態は、直接観察が可能なものについてのみ行った。

G. 分娩日の算定

分娩の確認は、午前9時~11時に限定し、この時間帯に分娩が完了していることを確認した動物について、その日を哺育0日、その前日を分娩日と規定した。午前11時を過ぎて分娩した動物については、翌日を分娩日とした。

分娩を確認した全例について妊娠期間(妊娠0日~分娩日の日数)を算定し、出産率[(生児出産雌数/受胎雌数)×100]を各群について求めた。

H. 病理組織検査

a) 雄動物

イ. 剖検, 器官重量および病理組織検査

最終投与日の投与終了後から絶食を開始し、翌日〔投与43日相当日〕にペントバルビタール深麻酔下で放血・致死させて剖検した。その際、全例について肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、甲状腺、精巣および精巣上体の重量を測定した。また、これらの器官のうち、精巣および精巣上体はブアン液に固定し、その他の器官および大脳、小脳、脊髄、心臓、肺、副腎、膀胱ならびに剖検において異常を認めた器官は、10%ホルマリンに固定した。これらの器官のうち、大脳、小脳、肝臓および腎臓は各群の全例について、その他の器官は、対照群および400 mg/kg投与群の全例について組織切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織検査を行った。また、必要に応じてOil red O染色も施して観察した。なお、脾臓および甲状腺の重量測定と病理組織検査、ならびに小脳、脊髄および肺の病理組織検査は、チオフェンの毒性情報として脾臓重量の低下が報告されていること、ならびに予備試験において肝臓重量が増加して酵素誘導が疑われたことから、脾臓重量と酵素誘導の指標となる甲状腺重量を測定し、病理組織検査を実施することとした。また、チオフェンは呼吸器から吸収されることから、肺の病理組織検査を実施した。さらに、チオフェンは小脳の特定の部位に壊死性の病変を形成することが報告されているので、投与量と病変との関連性を明らかにするために小脳および脊髄の病理組織検査を実施した。

ロ. 血液学検査

全例について、剖検に先立ち、ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈よりEDTAを抗凝固剤として採血し、赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、血色素量(Hb)、平均赤血球容積(MCV)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、血小板数を多項目血液自動測定機(Coulter Counter Model S-PLUS IV)により測定し、白血球百分比はWright-Giemsa染色を行い、光学顕微鏡下で観察して算出した。また、各群の5例については、EDTAを抗凝固剤とする採血に先立ち、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血し、血液凝固時間自動測定装置(クロテック)により、プロトロンビン時間(PT)および活性部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定した。

ハ. 血液生化学検査

全例について、血液学検査のための採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、それぞれ血漿を分離して遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-FARA)および全自動電解質分析装置EA-05(A & T)を用い、総蛋白濃度(ビウレット法)、アルブミン濃度(BCG法)、総コレステロール濃度(COD-DAOS法)、ブドウ糖濃度(グルコキナーゼG6PDH法)、尿素窒素濃度(ウレアーゼGLDH法)、クレアチニン濃度(Jaffe法)、アルカリフォスファターゼ活性(p-ニトロフェニルリン酸基質法)、GOT活性(SSCC法)、GPT活性(SSCC法)、総ビリルビン濃度(ビリルビン「ロシュ」キットSシリーズ)、カルシウム濃度(OCPC法)、無機リン濃度(モリブデン酸直接法)、γ-GTP活性(γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニト

ロアニリド基質法), ナトリウム濃度(イオン電極法), カリウム濃度(イオン電極法), 塩素濃度(イオン電極法), A/G比(計算)について分析した。

b) 雌動物

イ. 剖検, 器官重量および病理組織検査

交尾不成立雌は交配期間終了日に, 交尾したが分娩しない雌は妊娠25日相当日に, 致死量のペントバルビタールを投与後に放血・致死させ, 剖検した。分娩した雌は哺育4日に, また, 瀕死状態と判断された動物は, そのつど剖検した。妊・不妊のいずれの例においても卵巣および子宮を摘出し, 子宮については Salewski法¹⁵⁾を応用して着床痕を染色して着床数を確認した。卵巣はブアン液に固定して保存し, 実体顕微鏡下で黄体数を数えた。不妊例および交尾不成立例の卵巣については, 病理組織検査を行った。また, 肝臓, 腎臓および胸腺の重量を全例について測定した。これらの器官および大脳, 小脳, 脊髄, 心臓, 脾臓, 肺, 副腎, 甲状腺, 子宮, 膀胱および剖検において異常を認めた器官は10%ホルマリンに固定して保存した。これらの器官のうち, 大脳, 小脳, 肝臓, 腎臓, 胸腺および脾臓は各群の全例について, その他の器官は, 400 mg/kg投与群および対照群の全例について組織切片を作製し, ヘマトキシリン-エオジン染色を施して病理組織検査を行った。また, 必要に応じて Oil red O染色を行った。なお, 小脳, 脊髄, 脾臓, 肺および甲状腺および肺の病理組織検査は, 雄と同様の理由から実施した。

2) 出生児

A. 産児数の算定

哺育0日に産児数(生存児+死亡児)を調べ, 児の分娩率[(産児数/着床痕数)×100]および出生率[(出産児数/着床痕数)×100]を求めた。また, 産児の外表異常の有無および性別を調べた。

B. 死亡児数の算定

死亡児数を毎日調べ, 哺育0日の生存率[(生児数/産児数)×100]および新生児の生後4日の生存率[(哺育4日の生児数/哺育0日の生児数)×100]を求めた。死亡児は剖検し, 胸腔および腹腔内の器官を除去した後, エタノールに固定して保存した。

C. 体重測定

哺育0日および4日に一腹単位で雌雄別に体重(litter重量)を測定し, [litter重量/測定児数]を各腹について求めた。

D. 剖検

哺育4日に全例をエーテル吸入により致死させ, 剖検した。胸腔および腹腔内の器官は一括して摘出し, 一腹ごとに10%ホルマリンに固定して保存した。カーカスは, 一腹ごとにエタノールに固定して保存した。

7. 統計解析

交尾率, 受胎率および産児の形態異常発現頻度については χ^2 検定¹⁶⁾を行った。その他のすべてのデータは, 個体ごとに得られた値あるいは一腹ごとの平均値を1標

本として Bartlett法¹⁷⁾を用いて分散性の一様性についての検定し, 次いで, 一元配置型の分散分析¹⁷⁾あるいは Kruskal-Wallis順位検定²⁰⁾を行い, 対照群とチオフェン各投与群の差については Dunnett型¹⁸⁾あるいは Scheffé型¹⁹⁾の検定を行った。有意水準は, 5%および1%とした。病理組織検査結果については, Mann-WhitneyのU検定²¹⁾を用いて検定した。

結果

I. 反復投与毒性(親動物所見)

1) 死亡例, 瀕死屠殺例, 一般状態

雌雄ともにいずれの投与群にも死亡は認められず, 雄動物に瀕死屠殺例はなかった。雌では, 400 mg/kg投与群の1例が, 投与6日から失調歩行(ふらつき歩行)を示し, さらに投与8日には後肢が麻痺し削瘦したため, 瀕死状態にあると判断して剖検した。生存例の一般状態については, 雄では, 100 mg/kg以上の投与群において半眼, 不整呼吸, 自発運動量の低下あるいは腹臥姿勢, 寄り掛かり姿勢, 軟便ならびに流涎が観察された。さらに, 400 mg/kg投与群では流涎も観察された。これらの変化は, 投与開始後の早い時期に投与後一過性に観察されたが, 流涎は全投与期間にわたって観察された。その他の変化はチオフェンの投与量とは無関係に観察された。雌では, 400 mg/kg投与群において, 上述の瀕死屠殺例のほかに1例の動物に失調歩行が観察された。この動物は, 不妊であったため剖検したが, 剖検時まで回復は認められなかった。また, 分娩後の哺育期間中にも3例の動物が失調歩行を示し, このうち1例には強直性痙攣も観察された。その他, 400 mg/kg投与群では雄と同様に, 眼瞼下垂, 不整呼吸, 腹臥姿勢, 寄り掛かり姿勢および流涎が観察され, 削瘦および背弯姿勢も認められたが, 100 mg/kg投与群にはこれらの変化は認められなかった。また, すべてのチオフェン投与群に流涎が観察された。しかし, 流涎は, 100 mg/kg以上の投与群では比較的多くの動物に全投与期間にわたって観察されたのに対し, 25 mg/kg投与群では少数に一時的に観察されたのみであった。その他の変化は, チオフェンの投与量とは無関係に観察された。

2) 体重, 摂餌量(Tables 1~6)

雄では, 25 mg/kg投与群の体重推移および摂餌量には投与の影響は認められなかった。100 mg/kg以上の投与群において, 投与開始後一過性に体重増加および摂餌量の抑制が認められたが, 100 mg/kg投与群についてはいずれの時期の体重および摂餌量にも対照群との間に有意差は認められなかった。400 mg/kg投与群では, 投与1~8日の摂餌量および体重増加が抑制された(p<0.01)。その後の摂餌量は対照群と同様な値で推移し, 投与36~42日では対照群と比較して有意(p<0.05)な高値を示したが, 体重は, 投与全期間にわたり対照群と比較して有意(p<0.05, p<0.01)な低値で推移した。また, 対照群との間に有意差は認められなかったが, 投与36~42

Table 1 Body weight of male rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	25	100	400
Days of administration				
1 (Init. wt.)	299.3 ± 11.6 (13)	299.8 ± 12.9 (13)	298.9 ± 11.4 (13)	298.4 ± 10.1 (13)
8	341.7 ± 20.4 (13)	341.8 ± 23.0 (13)	328.2 ± 30.0 (13)	301.1 ± 16.2** (13)
15	380.3 ± 28.6 (13)	377.7 ± 30.3 (13)	362.2 ± 35.0 (13)	342.2 ± 21.8** (13)
22	400.3 ± 32.0 (13)	402.2 ± 32.8 (13)	383.7 ± 34.9 (13)	361.4 ± 28.1** (13)
29	423.6 ± 28.0 (13)	430.8 ± 35.9 (13)	413.1 ± 38.9 (13)	383.6 ± 33.2* (13)
36	447.6 ± 31.2 (13)	457.2 ± 41.1 (13)	436.4 ± 43.2 (13)	403.8 ± 36.9* (13)
42	462.2 ± 35.0 (13)	467.9 ± 45.3 (13)	444.8 ± 43.2 (13)	409.6 ± 44.6** (13)

Values are expressed as Mean ± S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

* : significant difference from control, $p < 0.05$

** : significant difference from control, $p < 0.01$

Table 2 Body weight gain of male rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	25	100	400
Days of administration				
1 ~ 8	42.4 ± 10.8 (13)	42.1 ± 11.2 (13)	29.3 ± 21.3 (13)	2.7 ± 11.6** (13)
8 ~ 15	38.5 ± 9.9 (13)	35.9 ± 8.9 (13)	34.1 ± 8.5 (13)	41.1 ± 11.4 (13)
15 ~ 22	20.1 ± 6.2 (13)	24.4 ± 5.8 (13)	21.5 ± 6.4 (13)	19.3 ± 9.6 (13)
22 ~ 29	23.3 ± 9.4 (13)	28.7 ± 5.6 (13)	29.4 ± 6.1 (13)	22.2 ± 8.2 (13)
29 ~ 36	24.0 ± 6.8 (13)	26.3 ± 7.3 (13)	23.3 ± 7.3 (13)	20.1 ± 6.6 (13)
36 ~ 42	14.5 ± 5.7 (13)	10.7 ± 6.0 (13)	8.3 ± 8.1 (13)	5.8 ± 11.6 (13)

Values are expressed as Mean ± S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

** : significant difference from control, $p < 0.01$

Table 3 Body weights of female rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	25	100	400
Days of administration (Pre-mating period)				
1 (Init. wt.)	216.2 ± 5.2 (13)	216.2 ± 5.3 (13)	216.1 ± 5.3 (13)	216.4 ± 5.0 (13)
8	232.0 ± 7.7 (13)	233.8 ± 4.4 (13)	229.3 ± 6.6 (13)	205.3 ± 23.9** (13)
15	250.2 ± 11.6 (13)	253.8 ± 8.5 (13)	250.6 ± 10.7 (13)	234.3 ± 11.7** (12)
Days of pregnancy				
0	254.9 ± 11.5 (11)	255.3 ± 4.5 (10)	257.2 ± 8.9 (11)	242.0 ± 10.4** (9)
7	292.1 ± 12.0 (11)	292.0 ± 8.1 (10)	295.4 ± 7.8 (11)	277.9 ± 11.6** (9)
14	330.4 ± 10.9 (11)	328.1 ± 14.6 (10)	330.7 ± 7.2 (11)	315.3 ± 14.0* (9)
20	396.2 ± 15.1 (11)	390.8 ± 26.5 (10)	393.3 ± 20.6 (11)	381.5 ± 21.7 (9)
Days of lactation				
0	304.1 ± 26.0 (11)	290.4 ± 30.0 (10)	287.7 ± 25.0 (11)	282.5 ± 19.6 (9)
4	321.4 ± 18.1 (11)	328.5 ± 17.4 (9)	307.2 ± 26.7 (10)	294.6 ± 38.5 (7)

Values are expressed as Mean ± S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

* : significant difference from control, $p < 0.05$

** : significant difference from control, $p < 0.01$

Table 4 Body weight gain of female rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		25		100		400	
Days of administration (Pre-mating period)								
1~8	15.8 ± 4.2	(13)	17.6 ± 3.7	(13)	13.1 ± 3.8	(13)	-11.1 ± 21.6**	(13)
8~15	18.2 ± 6.4	(13)	19.9 ± 7.4	(13)	21.3 ± 6.2	(13)	24.2 ± 11.6	(12)
Days of pregnancy								
0~7	37.2 ± 3.6	(11)	36.7 ± 6.4	(10)	38.2 ± 4.0	(11)	35.9 ± 6.1	(9)
7~14	38.3 ± 4.6	(11)	36.1 ± 7.3	(10)	35.3 ± 5.6	(11)	37.4 ± 5.2	(9)
14~20	65.8 ± 12.9	(11)	62.7 ± 15.2	(10)	62.6 ± 18.6	(11)	66.2 ± 12.6	(9)
Days of lactation								
0~4	17.3 ± 16.0	(11)	31.4 ± 15.8	(9)	16.1 ± 14.3	(10)	6.4 ± 28.6	(7)

Values are expressed as Mean ± S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

** : significant difference from control, p<0.01

Table 5 Food consumption of male rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		25		100		400	
Days of administration								
1~8	170.9 ± 16.9	(13)	172.5 ± 17.2	(13)	150.2 ± 30.4	(13)	122.5 ± 12.6**	(13)
8~15	166.0 ± 19.9	(13)	160.1 ± 23.0	(13)	153.8 ± 25.6	(13)	165.0 ± 19.2	(13)
29~36	147.0 ± 14.0	(13)	148.9 ± 14.7	(13)	153.4 ± 17.8	(13)	163.2 ± 22.5	(13)
36~42	124.4 ± 13.4	(13)	118.4 ± 14.0	(13)	125.1 ± 14.1	(13)	141.2 ± 20.8*	(13)

Values are expressed as Mean ± S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

* : significant difference from control, p<0.05

** : significant difference from control, p<0.01

Table 6 Food consumption of female rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		25		100		400	
Days of administration (Pre-mating period)								
1~8	119.0 ± 7.6	(13)	116.7 ± 5.3	(13)	109.7 ± 12.3	(13)	74.5 ± 22.9**	(13)
8~15	118.9 ± 8.9	(13)	117.1 ± 8.5	(13)	121.1 ± 10.3	(13)	126.7 ± 8.6	(12)
Days of pregnancy								
0~7	139.0 ± 5.5	(11)	137.5 ± 11.3	(10)	142.9 ± 10.9	(11)	136.2 ± 14.0	(9)
7~14	154.5 ± 6.8	(11)	150.0 ± 13.3	(10)	154.2 ± 11.2	(11)	150.8 ± 13.0	(9)
14~20	130.3 ± 6.5	(11)	128.0 ± 15.2	(10)	129.8 ± 10.1	(11)	133.3 ± 14.8	(9)
Days of lactation								
0~4	91.8 ± 14.5	(11)	99.4 ± 16.9	(9)	80.3 ± 31.2	(10)	65.6 ± 35.7	(7)

Values are expressed as Mean ± S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

** : significant difference from control, p<0.01

日の増加量は再びやや低値の傾向を示した。

雌では、100 mg/kg以下の投与群では、いずれの時期の体重および摂餌量にも対照群と比較して有意差は認められなかった。400 mg/kg投与群では、交配前の投与1～8日の摂餌量が対照群と比較して有意($p<0.01$)な低値を示し、体重が減少した。投与8～15日の摂餌量には、対照群との間に有意差は認められず、体重増加抑制も認められなくなったが、投与開始後の各時期の体重は対照群と比較して有意($p<0.01$)な低値を示した。妊娠期の摂餌量には対照群との間で有意差は認められなかったが、交配前の体重が低値であったために、妊娠0～14日の体重が対照群と比較して有意($p<0.05$, $p<0.01$)な低値を示した。哺育期には、哺育0～4日の摂餌量がやや低値の傾向を示したが、体重および摂餌量ともに対照群との間に有意差は認められなかった。

100 mg/kg投与群の1例の体重は、後述のII-1-2)分娩および哺育状態の項に記載した理由により評価の対象から除外した。

3) 尿検査所見

25 mg/kg投与群の尿検査所見は対照群と同様であった。100 mg/kg以上の投与群では、pHがアルカリに傾く動物が増加し、400 mg/kg投与群では、13例中11例が9以上を示した。その他の検査項目は、対照群と同様であった。

4) 解剖時検査所見

A. 雄〔解剖日：投与期間(42回投与)終了翌日〕

(1) 血液学検査所見(Table 7)

赤血球については、100 mg/kg以上の投与群において血色素量および平均赤血球血色素濃度が、軽度ではあるが用量依存的に有意($p<0.05$, $p<0.01$)に低下した。また、400 mg/kg投与群では、平均赤血球血色素量が有意($p<0.01$)に減少した。ヘマトクリット値は、すべてのチオフェン投与群が対照群と比較して有意($p<0.05$, $p<0.01$)な低値を示したが、その程度は生理的変動の範囲内であった。その他の項目については対照群とチオフェン各投与群との間に有意差は認められなかった。

白血球については、数および百分比のいずれにも対照群とチオフェン各投与群との間で有意差は認められなかった。

血液凝固に関連した検査項目では、400 mg/kg投与群においてAPTTが有意($p<0.05$)に短縮したが、PTについてはいずれのチオフェン投与群においても対照群との間に有意差は認められなかった。

(2) 血液生化学検査所見(Table 8)

対照群と比較して、100 mg/kg以上の投与群においてブドウ糖濃度が有意($p<0.01$)に減少した。また、無機リン濃度が有意($p<0.01$)に増加し、アルカリフォスファターゼ活性が有意($p<0.01$)に低下した。さらに、400 mg/kg投与群では、尿素窒素、総コレステロールおよび総ビリルビンの各濃度、ならびにGPT, GOTおよび γ -GTPの各活性がそれぞれ対照群と比較して有意

($p<0.05$, $p<0.01$)に上昇した。これらはいずれもチオフェンの用量に依存して変化した。このほか、ナトリウム濃度がチオフェン各投与群において、また、カリウムおよび塩素濃度が25 mg/kg投与群において有意($p<0.05$, $p<0.01$)な高値を示したが、いずれも用量に依存した変化ではなかった。総蛋白濃度、アルブミン濃度、A/G比、クレアチニン濃度およびカルシウム濃度については、対照群とチオフェン各投与群との間に有意差は認められなかった。

(3) 器官重量(Table 9)

25 mg/kg投与群では、重量および比体重値ともに対照群との間に有意差の認められる器官はなかった。100 mg/kg以上の投与群において肝臓および腎臓の比体重値が有意($p<0.01$)な高値を示した。また、400 mg/kg投与群では、脾臓重量が有意($p<0.01$)な低値を示した。400 mg/kg投与群における精巣上体重量は対照群と同様であったが、解剖時体重が対照群と比較して有意($p<0.01$)な低値を示したことから、比体重値が対照群と比較して有意($p<0.05$)な高値を示した。胸腺、精巣および甲状腺については、重量および比体重値ともに対照群との間で有意差は認められなかった。

(4) 剖検所見

肝臓では400 mg/kg投与群において2例に暗赤色化が、また、1例に退色がみられた。腫大は、チオフェン各投与群の1例ずつに認められ、黄色化が、対照群の4例、25 mg/kg投与群の5例、100 mg/kg投与群の3例および400 mg/kg投与群の1例にみられた。このほか、対照群の2例、25および100 mg/kg投与群の各4例、400 mg/kg投与群の1例に肝小葉の明瞭化がみられた。

腎臓では、400 mg/kg投与群に皮質の陥凹および退色が1例みられ、100 mg/kg投与群に腎乳頭の赤色化が1例みられた。また、25および100 mg/kg投与群の各1例、対照群の3例に腎盂の拡張が認められた。

肺では、対照群、100、および400 mg/kg投与群の各1例に暗赤色点、対照群の2例に灰白色域、1例に白色点がみられた。

甲状腺では100および400 mg/kg投与群の各2例に腫大、25 mg/kg投与群の1例に萎縮が認められた。

以上のほかに、対照群では胸腺の赤色点、心臓の白色点および精囊の萎縮が各1例にみられ、25 mg/kg投与群では副腎の腫大が2例に、100 mg/kg投与群では精巣上体の結節が1例にみられ、400 mg/kg投与群では、脾臓の萎縮を伴う退色、精巣および精巣上体の萎縮が各1例にみられた。また、100 mg/kg投与群では、水頭症が観察された。

(5) 病理組織検査所見(Table 10)

各器官における観察所見を以下に示す。

(小脳)

400 mg/kg投与群の1例に、IIIおよびVI～X葉の顆粒細胞層に局限して、顆粒細胞の核濃縮を伴うごく軽度な壊死が認められたが、白質板および分子層に変化は認められなかった。

Table 7 Hematology of male rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		25		100		400	
Male								
Red blood cells								
Count ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	804 \pm 39	(13)	770 \pm 42	(13)	769 \pm 31	(13)	788 \pm 37	(13)
Hemoglobin (g/dl)	15.4 \pm 1.0	(13)	14.7 \pm 0.5	(13)	14.3 \pm 0.4**	(13)	14.0 \pm 0.4**	(13)
Hematocrit (%)	43.5 \pm 2.2	(13)	41.9 \pm 1.6*	(13)	41.5 \pm 1.3**	(13)	41.4 \pm 1.1**	(13)
M C V (μm^3)	54.2 \pm 1.6	(13)	54.5 \pm 2.3	(13)	54.1 \pm 1.8	(13)	52.5 \pm 2.1	(13)
M C H (pg)	19.2 \pm 0.5	(13)	19.1 \pm 0.9	(13)	18.6 \pm 0.6	(13)	17.8 \pm 0.7**	(13)
M C H C (%)	35.4 \pm 0.8	(13)	35.1 \pm 0.6	(13)	34.5 \pm 0.5*	(13)	34.0 \pm 0.2**	(13)
White blood cells								
Count ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	68 \pm 15	(13)	56 \pm 10	(13)	59 \pm 15	(13)	62 \pm 17	(13)
Band neutrophil (%)	0 \pm 0	(13)	0 \pm 1	(13)	0 \pm 0	(13)	0 \pm 0	(13)
Segmented neutrophil (%)	15 \pm 7	(13)	16 \pm 7	(13)	18 \pm 6	(13)	11 \pm 5	(13)
Eosinophil (%)	1 \pm 1	(13)	1 \pm 2	(13)	0 \pm 1	(13)	1 \pm 1	(13)
Basophil (%)	0 \pm 0	(13)	0 \pm 0	(13)	0 \pm 0	(13)	0 \pm 0	(13)
Monocyte (%)	3 \pm 2	(13)	3 \pm 2	(13)	3 \pm 2	(13)	3 \pm 2	(13)
Lymphocyte (%)	81 \pm 7	(13)	79 \pm 8	(13)	79 \pm 7	(13)	86 \pm 6	(13)
Platelet								
Count ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	99.7 \pm 13.1	(13)	98.5 \pm 27.2	(13)	99.0 \pm 10.9	(13)	102.1 \pm 11.7	(13)
Coagulation time								
P T (sec)	15.3 \pm 1.1	(5)	16.4 \pm 2.4	(5)	15.4 \pm 1.5	(5)	14.6 \pm 1.4	(5)
A P T T (sec)	24.9 \pm 1.5	(5)	23.7 \pm 1.6	(5)	23.9 \pm 1.9	(5)	21.8 \pm 0.6*	(5)

Values are expressed as Mean \pm S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

* : significant difference from control, $p < 0.05$

** : significant difference from control, $p < 0.01$

Table 8 Blood chemistry of male rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		25		100		400	
Total protein (g/dl)	5.5 \pm 0.3	(13)	5.5 \pm 0.2	(13)	5.6 \pm 0.2	(13)	5.5 \pm 0.2	(13)
Albumin (g/dl)	3.1 \pm 0.1	(13)	3.1 \pm 0.1	(13)	3.1 \pm 0.1	(13)	3.1 \pm 0.1	(13)
A/G	1.33 \pm 0.15	(13)	1.28 \pm 0.20	(13)	1.21 \pm 0.07	(13)	1.26 \pm 0.14	(13)
B U N (mg/dl)	13 \pm 2	(13)	14 \pm 2	(13)	14 \pm 2	(13)	16 \pm 3**	(13)
Creatinine (mg/dl)	0.7 \pm 0.1	(13)	0.7 \pm 0.0	(13)	0.7 \pm 0.1	(13)	0.7 \pm 0.1	(13)
Glucose (mg/dl)	147 \pm 12	(13)	132 \pm 9	(13)	114 \pm 8**	(13)	120 \pm 18**	(13)
Total cholesterol (mg/dl)	39 \pm 6	(13)	35 \pm 6	(13)	45 \pm 7	(13)	51 \pm 9**	(13)
Total bilirubin (mg/dl)	0.08 \pm 0.03	(13)	0.08 \pm 0.02	(13)	0.09 \pm 0.01	(13)	0.17 \pm 0.05**	(13)
Na (mEq/l)	143.7 \pm 1.2	(13)	145.5 \pm 0.8**	(13)	145.7 \pm 0.8**	(13)	145.2 \pm 0.7**	(13)
K (mEq/l)	3.90 \pm 0.17	(13)	4.09 \pm 0.17*	(13)	3.88 \pm 0.15	(13)	3.98 \pm 0.20	(13)
Cl (mEq/l)	108.6 \pm 1.2	(13)	110.4 \pm 1.1**	(13)	108.9 \pm 1.0	(13)	108.6 \pm 0.8	(13)
Ca (mg/dl)	8.6 \pm 0.4	(13)	8.7 \pm 0.2	(13)	8.8 \pm 0.2	(13)	8.6 \pm 0.2	(13)
Inorg. phos. (mg/dl)	5.5 \pm 0.5	(13)	5.9 \pm 0.4	(13)	6.2 \pm 0.4**	(13)	6.5 \pm 0.4**	(13)
A L P (U/l)	273 \pm 36	(13)	254 \pm 43	(13)	222 \pm 41**	(13)	200 \pm 20**	(13)
G P T (U/l)	30 \pm 6	(13)	27 \pm 5	(13)	30 \pm 4	(13)	81 \pm 100**	(13)
G O T (U/l)	61 \pm 11	(13)	56 \pm 8	(13)	58 \pm 6	(13)	96 \pm 69*	(13)
γ -GTP (U/l)	0 \pm 0	(13)	0 \pm 0	(13)	0 \pm 1	(13)	1 \pm 1**	(13)

Values are expressed as Mean \pm S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

* : significant difference from control, $p < 0.05$

** : significant difference from control, $p < 0.01$

(肝臓)

100 mg/kg 投与群において、小葉中心部の肝細胞の肥大が7例、マクロファージの浸潤が4例にみられたが、小葉中心性の肝細胞壊死は認められなかった。400 mg/kg 投与群では、全例に軽度またはごく軽度な小葉中心性の肝細胞壊死と肝細胞の軽度な肥大が認められ、そのうちの11例に肝細胞細胞質の均質化または小空胞化とマクロファージの浸潤が認められた。小葉中心部の肝細胞細胞質の均質化および小空胞化が観察された例のうちの2例についてOil red O染色を行ったが、小空胞化した肝細胞には染色性を示す顆粒はほとんど認められなかった。その他、対照群およびチオフェン投与群に小肉芽腫や小葉中心性および周辺性の肝細胞の脂肪化がみられたが、対照群とチオフェン各投与群との間に頻度および程度の差は見られなかった。

(腎臓)

Eosinophilic bodyが対照群の1例、25 mg/kg 投与群の8例、100 mg/kg 投与群の6例および400 mg/kg 投与群の5例に認められたが、400 mg/kg 投与群では、他の投与群と比較してより多数のeosinophilic bodyが認められた。また、対照群では12例、25および100 mg/kg 投与群では各10例および400 mg/kg 投与群では7例に萎縮および再生性の尿細管がみられたが、対照群とチオフェン各投与群との間に頻度および程度の差は認められなかった。その他、腎盂の拡張が、対照群の4例ならびに、25および100 mg/kg 投与群の各1例にみられ、間質内のリンパ球の浸潤が、対照群の2例および25 mg/kg 投与群の1例に認められた。また、対照群では、髄質のごく少数の尿細管内に硝子円柱が2例にみられ、皮髄境界部にごく軽度なカルシウム沈着が1例にみられた。25 mg/kg 投与群では腎盂に移行上皮の限局性の軽度な過形成が1例にみられ、100 mg/kg 投与群では皮質の尿細管のごく軽度な拡張が1例にみられた。

(肺)

対照群の4例および400 mg/kg 投与群の2例の動脈壁にカルシウム沈着、対照群の9例および400 mg/kg 投与群の2例に肺胞内の泡沫細胞の集簇がみられ、そのうち対照群の3例ではマクロファージ、好中球およびリンパ球の浸潤を伴う肺炎が認められた。

(脾臓)

対照群および400 mg/kg 投与群の全例に髄外造血および色素沈着がみられた。

(心臓)

対照群の4例および400 mg/kg 投与群の1例に限局性のごく軽度な心筋壊死がみられた。

(膀胱)

対照群の1例および400 mg/kg 投与群の2例に粘膜上皮のごく軽度なびまん性の過形成がみられた。

(精巣上体)

対照群の1例および400 mg/kg 投与群の3例にごく軽度なリンパ球の浸潤が、また、対照群の1例に軽度な精子肉芽腫がみられたが、400 mg/kg 投与群と対照群との間に程度および頻度の差は認められなかった。400

mg/kg 投与群の1例に精細管内生殖細胞の壊死・変性が認められた。

(精巣)

400 mg/kg 投与群の1例の精細管が萎縮し、生殖細胞が減少しており、間質細胞のごく軽度な過形成がみられ、その例の精巣上体では管腔内に壊死および変性した生殖細胞がみられた。

(大脳、胸腺、甲状腺、副腎および脊髄)

いずれの投与群にも変化はみられなかった。

B. 雌〔解剖日：瀕死屠殺日、哺育4日(出生児生存)、哺育4日(全出生児死亡)、妊娠25日相当日(不妊および全胚死亡例)、交配期間終了日(交尾不成立例)〕

(1) 剖検所見

肝臓では、色調の変化がチオフェン各投与群で観察された。25および100 mg/kg 投与群では、暗赤色化が少数に観察されたが、400 mg/kg 投与群では、暗赤色化が4例に観察された他に、灰白色および黄色域が3例に、また、赤色域が2例に観察された。400 mg/kg 投与群の瀕死屠殺例では、前記の赤色域の他に黄色化も観察された。小葉の明瞭化も400 mg/kg 投与群の瀕死屠殺例を含むチオフェン各投与群に少数例ずつ観察された。このほか、400 mg/kg 投与群では腫大が1例に認められた。また、25 mg/kg 投与群では横隔膜ヘルニアが1例に認められた。

胸腺では、チオフェン各投与群の分娩例および400 mg/kg 投与群の瀕死屠殺例に萎縮が観察された。25 mg/kg 投与群では、2例と少なかったが、100 mg/kg 投与群では4例、400 mg/kg 投与群では6例と用量の増加に伴って増加した。このほか、対照群の1例に赤色点のみられた。

脾臓では100 mg/kg 投与群の1例、瀕死屠殺例を含む400 mg/kg 投与群の4例に萎縮が認められ、対照群では陥凹部が、また、400 mg/kg 投与群では濾胞の不明瞭化がそれぞれ1例ずつにみられた。

肺では、25 mg/kg 投与群の2例に暗赤色点が認められた。

副腎では、対照群に暗調の混濁化が、また、100 mg/kg 投与群に腫大がそれぞれ1例に認められた。

腹部および陰部の被毛の汚れは、100 mg/kg 投与群の2例および、瀕死屠殺した400 mg/kg 投与群の1例に認められた。

その他、対照群では、前胃に黄色物沈着が、25 mg/kg 投与群では、脾臓の赤色化が、100 mg/kg 投与群では、腎臓皮質の退色化が、それぞれ1例に認められた。また、100 mg/kg 投与群の全胚死亡例では、子宮の暗赤色化および肥厚、ならびに腔に暗赤色液の貯留が認められた。400 mg/kg 投与群では、甲状腺の腫大が1例に認められた。また、瀕死屠殺した400 mg/kg 投与群の動物には、顎下腺の萎縮、腎臓髄質の赤色化、腺胃にヘマチンの付着、胃および腸管の内容物の著しい減少が認められた。

(2) 器官重量(Table 9)

哺育4日出生児生存例では、100 mg/kg 以下の投与群

Table 9 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose (mg/kg)	0	25	100	400	
Male	Final body weight (g)	439.7 ± 33.9 (13)	445.1 ± 43.7 (13)	419.7 ± 40.6 (13)	381.4 ± 41.5** (13)	
	Liver (g)	12.49 ± 1.27 ^a (13) 2.84 ± 0.17 ^b	13.04 ± 1.84 (13) 2.92 ± 0.17	13.00 ± 1.76 (13) 3.09 ± 0.17**	13.56 ± 1.61 (13) 3.55 ± 0.16**	
	Kidneys (g)	2.65 ± 0.25 (13) 0.60 ± 0.04	2.78 ± 0.30 (13) 0.63 ± 0.04	2.89 ± 0.39 (13) 0.69 ± 0.04**	2.65 ± 0.33 (13) 0.69 ± 0.04**	
	Thymus (mg)	346.7 ± 92.8 (13) 79.1 ± 21.1	324.6 ± 57.0 (13) 72.9 ± 11.3	305.5 ± 86.4 (13) 73.1 ± 21.8	309.7 ± 53.2 (13) 82.2 ± 17.5	
	Testes (g)	3.09 ± 0.20 (13) 0.71 ± 0.06	2.96 ± 0.25 (13) 0.67 ± 0.08	3.24 ± 0.18 (13) 0.78 ± 0.07	2.91 ± 0.37 (13) 0.77 ± 0.13	
	Epididymides (g)	1.09 ± 0.08 (13) 0.25 ± 0.02	1.09 ± 0.12 (13) 0.25 ± 0.03	1.16 ± 0.08 (13) 0.28 ± 0.03	1.06 ± 0.11 (13) 0.28 ± 0.04*	
	Spleen (g)	0.72 ± 0.12 (13) 0.16 ± 0.02	0.73 ± 0.14 (13) 0.16 ± 0.02	0.68 ± 0.14 (13) 0.16 ± 0.03	0.54 ± 0.09** (13) 0.14 ± 0.02	
	Thyroid glands (mg)	15.4 ± 3.3 (13) 3.5 ± 0.8	15.5 ± 4.2 (13) 3.5 ± 0.8	17.8 ± 4.9 (13) 4.3 ± 1.2	14.6 ± 4.1 (13) 3.8 ± 1.1	
	Female	Final body weight (g)	321.4 ± 18.1 (11)	328.5 ± 17.4 (9)	307.2 ± 26.7 (10)	294.6 ± 38.5 (7)
	Liver (g)	12.53 ± 0.79 (11) 3.90 ± 0.25	13.21 ± 0.77 (9) 4.03 ± 0.19	13.01 ± 1.02 (10) 4.26 ± 0.44	13.89 ± 1.60 (7) 4.77 ± 0.74**	
Kidneys (g)	1.94 ± 0.13 (11) 0.60 ± 0.04	1.88 ± 0.12 (9) 0.57 ± 0.04	1.95 ± 0.12 (10) 0.64 ± 0.05	2.10 ± 0.21 (7) 0.71 ± 0.03**		
Thymus (mg)	245.2 ± 114.3 (11) 75.5 ± 32.6	204.0 ± 81.7 (9) 61.4 ± 22.3	188.4 ± 102.8 (10) 59.6 ± 28.2	170.8 ± 109.8 (7) 55.1 ± 31.3		

Values are expressed as Mean ± S.D.
 Parenthesis indicates number of animals.
 a: absolute weight
 b: relative weight (g or mg per 100 g body weight)
 *: significant difference from control, p<0.05
 **: significant difference from control, p<0.01

には、重量および比体重値ともに対照群と比較して有意差の認められた器官はなかった。400 mg/kg 投与群では、肝臓および腎臓の比体重値が対照群と比較して有意 (p<0.01) な高値を示した。しかし、胸腺重量については対照群との間に有意差は認められなかった。

瀕死屠殺、交尾不成立および不妊であったため、途中剖検した動物においても400 mg/kg 投与群では、肝臓および腎臓の比体重値が高値の傾向を示した。また、瀕死屠殺例および全出生児死亡例では、チオフェンの用量とは無関係に胸腺重量が低値の傾向を示した。

(3) 病理組織所見 (Table 10)

各器官における観察所見を以下に示す。

(大脳)

400 mg/kg 投与群で小脳に明らかな変化を示した例のうち、瀕死屠殺例を含む4例に脳室の軽度な拡張が、また、3例に脳室周囲のごく軽度な浮腫が認められた。

(小脳)

100 mg/kg 投与群では、1例にごく軽度な顆粒細胞の壊死が認められたが、400 mg/kg 投与群では、核濃縮を

伴う顆粒細胞の壊死が8例に認められた。さらに、400 mg/kg 投与群の顆粒細胞の壊死巣付近では、白質板の壊死が7例に、また、分子層の軽度な空胞化およびプルキンエ細胞の変性または脱落が各6例にみられ、壊死巣内および周囲では脂肪顆粒細胞の浸潤が4例に、出血が4例に、また、カルシウム沈着が3例にみられた。顆粒細胞、白質板および分子層に強い変化がみられた例の小脳核では、多数の神経細胞の空胞変性が4例に、また、軽度な浮腫が2例に認められた。顆粒細胞が著しい壊死を起こし、白質板にも明らかな壊死が認められた例の病変域はほぼ全葉に及んでおり、特に、II~IV、IXまたはX葉の顆粒細胞層では変化が強く、IIIおよびIV葉では分子層およびプルキンエ細胞にも明らかな変化がみられた。一方、小脳の変化が軽度な例では、病変部は顆粒細胞層にはほぼ限局しており、主にII、IIIまたはIX葉に変化がみられた。これらの変化は、投与8日に行った瀕死屠殺例や、不妊解剖を行った例など、試験途中で剖検した400 mg/kg 投与群の非妊娠動物にも認められた。

Table 10 Histopathological findings of rats treated orally with thiophene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ [Number of animals examined] Findings, grade and number of animals	Sex: Dose (mg/kg):	male				female			
		0	25	100	400	0	25	100	400
Cerebrum		[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Dilatation of ventricle	total	0	0	0	0	0	0	0	4
	+	0	0	0	0	0	0	0	4
Edema around ventricle	total	0	0	0	0	0	0	0	3
	±	0	0	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	0	0	0	0	1
Cerebellum		[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Pyknosis/necrosis of granular cells	total	0	0	0	1	0	0	1	8**
	±	0	0	0	1	0	0	1	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	3
	++	0	0	0	0	0	0	0	2
	+++	0	0	0	0	0	0	0	3
Vacuolation in molecular layer	total	0	0	0	0	0	0	0	6
	±	0	0	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	0	0	0	0	4
Necrosis in laminae albae	total	0	0	0	0	0	0	0	7*
	±	0	0	0	0	0	0	0	3
	++	0	0	0	0	0	0	0	4
Hemorrhage in necrotic foci	total	0	0	0	0	0	0	0	4
	±	0	0	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	0	0	0	0	2
Degeneration/loss of Purkinje cells	total	0	0	0	0	0	0	0	6
	±	0	0	0	0	0	0	0	1
	+	0	0	0	0	0	0	0	3
	++	0	0	0	0	0	0	0	2
Infiltration of fat granule cells around the necrosis	total	0	0	0	0	0	0	0	4
	±	0	0	0	0	0	0	0	1
	++	0	0	0	0	0	0	0	2
	+++	0	0	0	0	0	0	0	1
Calcification in necrotic foci	total	0	0	0	0	0	0	0	3
	±	0	0	0	0	0	0	0	1
	+	0	0	0	0	0	0	0	2
Vacuolar degeneration of neurons in cerebellar nuclei	total	0	0	0	0	0	0	0	4
	++	0	0	0	0	0	0	0	3
	+++	0	0	0	0	0	0	0	1
Edema in cerebellar nuclei	total	0	0	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	0	0	0	0	2
Liver		[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Necrosis of hepatocyte in central zone	total	0	0	0	13**	0	0	3	5
	±	0	0	0	4	0	0	2	0
	+	0	0	0	9	0	0	1	0
	++	0	0	0	0	0	0	0	3
	+++	0	0	0	0	0	0	0	2
Homogenous or vesicula changes of hepatocyte in central zone	total	0	0	0	11**	0	0	1	4
	±	0	0	0	1	0	0	0	0
	+	0	0	0	5	0	0	1	2
	++	0	0	0	5	0	0	0	2
Hypertrophy of hepatocyte in central zone	total	0	0	7*	13**	0	0	11**	13**
	±	0	0	7	1	0	0	10	4
	+	0	0	0	9	0	0	1	6
	++	0	0	0	3	0	0	0	3

±: very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe

*: Significant difference from control, $p < 0.05$ **: Significant difference from control, $p < 0.01$

Table 10 (Continued)

Organ [Number of animals examined]	Sex:	male				female			
		Dose (mg/kg): 0	25	100	400	0	25	100	400
Liver									
Infiltration of macrophages in central zone	total	0	0	4	11**	0	0	5	4
	±	0	0	4	3	0	0	3	2
	+	0	0	0	4	0	0	1	2
	++	0	0	0	4	0	0	1	0
Infiltration of macrophages around necrotic area	total	0	0	0	0	0	0	0	4
	+	0	0	0	0	0	0	0	2
	++	0	0	0	0	0	0	0	2
Infiltration of neutrophil in necrotic area	total	0	0	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	0	0	0	0	1
	++	0	0	0	0	0	0	0	1
Hemorrhage	total	0	0	0	0	0	0	0	3
	+	0	0	0	0	0	0	0	3
Fatty change of hepatocyte in central zone	total	13	13	13	13	5	6	9	12*
	±	10	11	4	10	5	6	8	11
	+	3	2	9	3	0	0	1	1
Fatty change of hepatocyte in peripheral zone	total	13	13	13	13	13	13	13	13
	±	0	0	0	0	6	8	7	9
	+	5	5	7	6	6	4	5	3
	++	8	8	6	7	1	1	1	1
Microgranuloma	total	13	13	13	10*	13	9	12	10
	±	7	11	8	10	12	9	10	9
	+	6	2	5	0	1	0	2	1
Infiltration of lymphocytes	total	0	0	0	0	1	0	0	0
	±	0	0	0	0	1	0	0	0
Increased number of mitosis of hepatocyte	total	0	0	0	0	0	0	0	1
	+	0	0	0	0	0	0	0	1
Kidney									
Eosinophilic body	total	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
	±	1	8*	6	5	0	0	0	0
	+	1	7	6	0	0	0	0	0
	++	0	1	0	3	0	0	0	0
Atrophic/regenerated tubules in cortex	total	12	10	10	7	8	10	7	4
	±	11	10	10	6	8	10	7	3
	+	1	0	0	1	0	0	0	1
Vacuolar degeneration of tubular epithelium	total	0	0	0	0	0	3	11**	8**
	±	0	0	0	0	0	3	4	4
	+	0	0	0	0	0	0	3	3
	++	0	0	0	0	0	0	4	1
Focal dilatation of tubular lumen in medulla	total	0	0	0	0	1	0	0	3
	±	0	0	0	0	1	0	0	3
Focal dilatation of tubular lumen in cortex	total	0	0	1	0	0	0	0	0
	±	0	0	1	0	0	0	0	0
Calcification of cortico-medullary junction	total	1	0	0	0	1	0	0	2
	±	1	0	0	0	1	0	0	2
Infiltration of lymphocytes in interstitium	total	2	1	0	0	1	0	2	0
	±	2	1	0	0	1	0	2	0

±:very slight;+, slight; ++, moderate; +++, severe

*:Significant difference from control, p<0.05

** :Significant difference from control, p<0.01

Table 10 (Continued)

Organ [Number of animals examined] Findings, grade and number of animals	Sex: Dose (mg/kg):	male				female			
		0	25	100	400	0	25	100	400
Kidney									
Hyaline cast in medulla	total	2	0	0	0	0	0	0	0
	±	2	0	0	0	0	0	0	0
Focal hyperplasia of transitional epithelium in renal pelvis	total	0	1	0	0	0	0	0	0
	+	0	1	0	0	0	0	0	0
Dilatation of renal pelvis	total	4	1	1	0	0	0	0	0
	+	4	1	1	0	0	0	0	0
Focal fibrosis in cortex	total	0	0	0	0	1	1	2	0
	±	0	0	0	0	1	1	2	0
Thymus									
Atrophy	total	[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
	±	0			0	3	3	6	6
	+	0			0	3	1	1	1
	++	0			0	0	1	3	3
	+++	0			0	0	1	1	2
Spleen									
Decrease of blood content in red pulp	total	[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
	±	0			0	0	2	2	3
	+	0			0	0	2	2	2
		0			0	0	0	0	1
Atrophy of follicle	total	0			0	0	0	0	1
	+	0			0	0	0	0	1
Extramedullary hematopoiesis	total	13			13	13	13	12	12
	±	13			12	1	2	5	5
	+	0			1	9	7	6	6
	++	0			0	3	4	1	1
Deposits of pigment	total	13			13	13	13	13	13
	±	12			13	0	1	3	0
	+	1			0	13	10	10	8
	++	0			0	0	2	0	5
Lung									
Aggregation of foamy cells in alveolus	total	[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
	±	9			2*	10			7
	+	7			2	8			7
		2			0	2			0
Alveolitis with infiltration of macrophages/neutrophils /lymphocytes	total	3			0	0			0
	+	3			0	0			0
Calcification in artery	total	4			2	1			1
	±	4			2	1			1
Heart									
Focal necrosis of myocardial fiber	total	[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
	±	4			1	1			3
		4			1	1			3
Adrenal gland									
Necrosis of fascicular and reticular zone	total	[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
	+++	0			0	0			1
		0			0	0			1

±: very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe

*: Significant difference from control, p<0.05

**: Significant difference from control, p<0.01